

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 39 39 200 A 1

21 Aktenzeichen: P 39 39 200.7
22 Anmeldetag: 27. 11. 89
43 Offenlegungstag: 29. 5. 91

51 Int. Cl.⁵:
C 12 N 1/00
C 12 N 1/21
C 07 K 13/00
C 12 N 15/09
C 12 P 21/02
C 12 P 21/08
G 01 N 33/569
// (C12N 1/20,
C12R 1:19)

DE 39 39 200 A 1

71 Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

74 Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

72 Erfinder:

Kandolf, Reinhard, Dr., 8000 München, DE

54 Enterovirale Polypeptide und gruppenspezifischer Nachweis von Enterovirusinfektionen

Es wird ein Polypeptid beschrieben, das für die Gruppe der
Enteroviren spezifisch ist und zum Nachweis von Infektionen
mit diesen Viren eingesetzt werden kann.

DE 39 39 200 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Polypeptide, DNA-Sequenzen, welche für diese Polypeptide kodieren, die Verwendung dieser Polypeptide und einen gruppenspezifischen Test zum Nachweis von Enteroviren sowie enteroviralen Antikörpern.

In der klinischen Praxis spielt die Serodiagnose viraler Infektionen eine zentrale Rolle, die jedoch im Falle von Infektionen mit Enteroviren, welche die häufigste Ursache der viralen Myocarditis des Menschen darstellen, aufgrund der Vielzahl cardiotroper Enteroviren mit über 70 verschiedenen Serotypen ein bislang ungelöstes Problem darstellt. Die Enteroviren sind eine Gruppe von Viren, die zunächst den Respirations- oder Gastrointestinaltrakt infizieren, sich dort vermehren und sodann im Falle einer Virämie verschiedene Zielorgane infizieren, wie z. B. das Herz, das Pankreas, das zentrale Nervensystem oder das Rückenmark. Beispiele für diese Viren sind das Poliovirus, das Echovirus und das Coxsackie-Virus. Typische Erkrankungen nach Infektion mit solchen Viren sind Myocarditis, Pankreatitis und Meningitis. Die Enteroviren gehören zu der Gruppe der RNA-Viren.

Im Hinblick auf die Häufigkeit gerade von viralen Herzerkrankungen kommt der Gruppe der Enteroviren eine sehr große klinische Bedeutung zu. Der Nachweis von Enterovirus-Infektionen als Ursache viraler Herzerkrankungen oder die prophylaktische Untersuchung bei Verdacht auf eine Enterovirus-Infektion machte bisher außerordentliche Schwierigkeiten. Eine spezifische Diagnose und damit eine Bestätigung eines klinischen Verdachts auf eine virale Herz-, oder andere Erkrankung nach Methoden des bisherigen Standes der Technik ist außerordentlich schwierig. Hierzu wurden bisher nämlich Hyperimmunseren eingesetzt, die gegen gereinigte Viruspartikel einzelner Serotypen hergestellt wurden. Es war damit nur möglich, jeweils genau diejenigen Viren nachzuweisen, gegen die die Hyperimmunseren erzeugt worden waren. Da jedoch, wie bereits oben ausgeführt, über 70 verschiedene Serotypen cardiotroper Enteroviren existieren, war hierdurch ein umfassender Erregernachweis nicht möglich. Obwohl eine Reihe von antigenen Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Enteroviren beschrieben wurde, war bislang eine Enterovirus-gruppenspezifische Serodiagnostik aufgrund der antigenen Heterogenität zwischen und innerhalb distinkter Serotypen überaus unbefriedigend bzw. nicht möglich. Zudem bestand bislang keine Möglichkeit zum Nachweis von Antikörpern gegen enterovirale RNA-Polymerasen.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, die Voraussetzungen für einen gruppenspezifischen Nachweis, der für die gesamte Familie der Enteroviren spezifisch ist, zu schaffen, anhand dessen die An- oder Abwesenheit dieser Viren sowie deren Antikörper im Blut oder Serum von Patienten bestimmbar ist.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die erfindungsgemäßen Polypeptide, nämlich mit der Sequenz

```

MGAQVSTQ KTGAEHTRLN ASGNSIIHYT NINYYKDAAS NSANRQDFTQ
DPGKFTEPVK DIMIKSLPAL NSPTVEECGY SDRARSITLG NSTITTQECA
NVVVGYGVWP DYLDSEATA EDQPTQPDVA TCRFYTLDSV QWQKTS PGWW
WKLPDALSNL GLFGQNMQYH YLGRTGYTVH VQCNASKFHQ GCLLVVCVPE
AEMGCATLDN TPSSAELLGG DTAKEFADKP VASGSNKLVDQ RVVYNAGMGV
GVGNLTIFPH QWINLRTNNS ATIVMPYTNS VPMDNMFRHN NVTLMVIPFV
PLDYCPGSTT YVPITVTIAP MCAEYNGRLR AGHQGLPTMN TPGSCQFLTS
DDFQSPSAMP QYDVTPEMRI PGEVKNLMEI AEVDSVVPVQ NVGEKVNSME
AYQIPVRSNE GSGTQVFGFP LQPGYSSVFS RTLLGEILNY YTHWSGSIKL

```

DE 39 39 200 A1

TFMFCGSAMA TGKFLLAYSP PGAGAPTKRV DAMLGTHVIW DVGLQSSCVL
CIPWISQTHY RFVASDEYTA GGFITCWYQT NIVVPADAQS SCYIMCFVSA
CNDFSVRLLK DTPFISQQNF FQGPVEDAIT AAIGRVADTV GTGPTNSEAI 5
PALTAAETGH TSQVVPGDTM QTRHVKNYHS RSESTIENFL CRSACVYFTE
YKNSGAKRYA EWLTPRQAA QLRRKLEFFT YVRFDLELTF VITSTQQPST
TQNQDAQILT HQIMYVPPGG PVPDKVDSYV WQTSTNPSVF WTEGNAPPRM 10
SIPFLSIGNA YSNFYDGWSE FSRNGVYGIN TLNNMGTLYA RHNAGSTGP
IKSTIRIYFK PKHVKAWIPIR PPRLCQYEKA KNVNFQPSGV TTTRQSITM
TNTGAFGQQS GAVYVGNYRV VNRHLATSAD WQNCVWESYN RDLLVSTTTA 15
HGCDIIARCQ CTTGVYFCAS KNKHYPISFE GPGLVEVQES EYYPRRYQSH
VLLAAGFSEP GDCGGILRCE HGVIGIVTMG GEGVVGFIADI RDLLWLEDDA 20
MEQGVKDYVE QLGNAFGSGF TNQICEQVNL LKESLVGQDS ILEKSLKALV
KIISALVIVV RNHDDLITVT ATLALIGCTS SPWRWLKQKV SQYYGIPMAE
RQNNRWLKKF TEMTNACKGM EWIIVKIQKF IEWLKVKILP EVREKHEFLN 25
RLKQLPLLES QIATIEQSAP SQSDQEQLFS NVQYFAHYCR KYAPLYAAEA
KRVFSLEKKM SNYIQFKSKC RIEPVCLLLH GSPGAGKSAV TNLIGRSLAE
KLNSSVYSLP PDPDHFDPYK QQAVVIMDDL CQNPDPGKDV LFCQMVSSVD 30
FVPPMAALEE KGILFTSPFV LASTNAGSIN APTVSDSRAL ARRFHFDMMI
EVISMYSQNG KINMPMSVKT CDDECCPVNF KKCCPLVCGK AIQFIDRRRTQ
VRYSLDMLVT EMFREYNHRH SVGTTLEALF QGPPVYREIK ISVAPETPPP 35
PAIADLLKSV DSEAVREYCK EKGWLVEPIN STLQIEKHVS RAFICLQALT
TFVSVAGIY IYKLFAGFQ GAYTGVPNQK PRVPTLRQAK VQGPAPFAV
AMMKRNSSTV KTEYGEFTML GIYDRWAVLP RHAKPGPTIL MNDQEVGVLD 40
AKELVDKDG T NLELTLLKLN RNEKFRDIRG FLAKEEVEVN EAVLAINTSK
FPNMYIPVGQ VTEYGFLNLG GTPTKRMLMY NFPTRAGQCG GVLMTGKVL 45
GIHVGGNGHQ GFSALLKHY FNDEQGEIEF IESSKDAGFP VINTPSKTKL
EPSVFHQVFE GNKEPAVLRS GDPRLKANFE EAIFSKYIGN VNTHVDEYML
EAVDHYAGQL ATLDISTEPM KLEDAVYGTE GLEALDLTTS AGYPYVALGI 50
KKRDILSKKT KDLTKLKECM DKYGLNLPV TYVKDELRSI EKVAKGKSRL
IEASSLNDV AMRQTFGNLY KTFHLNPGVV TGSVAGCDPD LFWSKIPVML 55
DGHIAFDYS GYDASLSPVW FACLKMLLEK LGYTHKETNY IDYLCNSHHL
YRDKHYFVRG GMPSGCSGTS IFNSMINNII IRTLMKVVYK GIDLQFRMI
AYGDDVIASY PWPIDASLLA EAGKGYGLIM TPAKGEFCFN EVTWTNATFL 60
KRYFRADEQY PFLVHPVMPM KDIHESIRWT KDPKNTQDHV RSLCLLAWHN
GEHEYEEFIR KIRSVPVGRC LTLPAFSTLR RKWLDSF 65

bzw. den bevorzugten Polypeptiden, deren Teilsequenzen von Aminosäure 3 bis 448 (VP4/2/3, Aminosäure 516 bis 952 (VP1) oder Aminosäure 1769 bis 2129 (Polymerase) in den Ansprüchen 2 bis 4 angegeben sind. Die erfindungsgemäß bevorzugten Polypeptide stellen distinkte, bakteriell synthetisierte virale Strukturproteine,

(VP4/2/3 bzw. VP1); sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase von Coxsackie-Virus B3 dar.

Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, daß vor allem die viralen Strukturproteine VP4/2/3 und VP1, aber auch die Polymerase zur Bildung von Antikörpern führen, welche für die gesamte Gruppe der Enteroviren spezifisch sind. Es ist nämlich erfindungsgemäß erstmals gelungen, Polypeptide mit antigenen Eigenschaften ausfindig zu machen, die offensichtlich allen der über 70 Serotypen von Enteroviren gemeinsam sind.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sind Polypeptide, die wenigstens eine der auf den erfindungsgemäßen Polypeptiden vorhandene antigene Determinante aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante DNA, welche einligiert in einen geeigneten Expressionsvektor, eine DNA-Sequenz enthält, die für ein erfindungsgemäßes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert. Als Expressionsvektor sind hierbei alle für die Expression in Wirtszellen geeigneten Moleküle verwendbar, wie Plasmide, Cosmide, Phagengenome in ihrer doppelsträngigen (RF)-Form und andere. Die Auswahl des richtigen Vektormoleküls ist hierbei von der Auswahl zur Expression zu verwendender Wirtszellen abhängig und dem Fachmann geläufig.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die rekombinante DNA die folgende Sequenz:

DE 39 39 200 A1

1 UUAAAACAGC CUGUGGGUUG AUCCCACCCA CAGGCCCAU U GGGCGCUAGC
 51 ACUCUGGUU AU CACGGUACCU UUGUGCGCCU GUUUUAUACC CCCUCCCCCA
 101 ACUGUAACU U AGAAGUAACA CACACCGAUC AACAGUCAGC GUGGCACACC 5
 151 AGCCACGUU U UGAUCAAGCA CUUCUGUUA C CCCGGACUGA GUAUCAAUAG
 201 ACUGCUCAG C CGGUUGAAG AGAAAGCGU U CGUUAUCCGG CCAACUACU U
 251 CGAAAAACCU AGUAACACCG UGGAAGUUGC AGAGUGUUU C GCUCAGCACU 10
 301 ACCCCAGUG U AGAUCAGGUC GAUGAGUCAC CGCAUUCCCC ACGGGCGACC
 351 GUGGCGGUG G CUGCGUUGGC GGCCUGCCCA UGGGGAAACC CAUGGGACGC
 401 UCUAAUACAG ACAUGGUGCG AAGAGUCU AU UGAGCUAGU GGUAGUCCUC 15
 451 CGCCCCUGA AUGCGGCUAA UCCUAACUGC GGAGCACACA CCCUCAAGCC
 501 AGAGGGCAG U GUGUCGUAA C GGGCAACUCU GCAGCGGAAC CGACUACUU U
 551 GGGUGUGCG U GUUUCAUUU AUUCCUAUAC UGGCUGCUUA UGGUGACAA U 20
 601 UGAGAGAUC G UUACCAUAU GCUAUUGGAU UGGCCAUCCG GUGACUAAU A
 651 GAGCUAUUA U AUAUCCCUU GUUGGGUUUA UACCACUUAG CUUGAAAGAG 25
 701 GUUAAAACAU UACA AUUCAU UGUUAAGUUG AAUACAGCAA AAUGGGAGCU
 751 CAAGUAUCA CGCAAAAGAC UGGGGCACAU GAGACCAGGC UGAAUGCUAG
 801 CGGCAAUUC AUCAUUCACU ACACAAAU AU UAAUUUAUUAC AAGGAUGCCG 30
 851 CAUCCAACUC AGCCAAUCGG CAGGAUUUCA CUCAAGACCC GGGCAAGUUC
 901 ACAGAACCAG UGAAAGAU AU CAUGAUUAAA UCACUACCAG CUCUCAACUC
 951 CCCACAGUA GAGGAGUGCG GAUACAGUGA CAGGGCGAGA UCAAUCACAU 35
 1001 UAGGUAACUC CACCAUAACG ACUCAGGAU GCGCCAACGU GGUGGUGGGC
 1051 UAUGGAGUAU GGCCAGAUUA UCUAAAGGAU AGUGAGGCAA CAGCAGAGGA 40
 1101 CCAACCGACC CAACCAGACG UUGCCACAUG UAGGUUCU AU ACCCUUGACU
 1151 CUGUGCAAUG GCAGAAAACC UCACCAGGAU GGUGGUGGAA GCUGCCCGAU
 1201 GCUUUGUCGA ACUAGGACU GUUUGGGCAG AACAUGCAGU ACCACUACU U 45
 1251 AGGCCGAACU GGUUAUACCG UACAUGUGCA GUGCAAUGCA UCUAAGUUC
 1301 ACCAAGGAUG CUUGCUAGUA GUGUGUGUAC CGGAAGCUGA GAUGGGUUGC
 1351 GCAACGCUAG ACAACACCCC AUCCAGUGCA GAAUUGCUGG GGGGCGAUAC 50
 1401 GGCAAAGGAG UUUGCGGACA AACCGGUCGC AUCCGGGUCC AACAAGUUG
 1451 UACAGAGGGU GGUGUAUAU GCAGGCAUGG GGGUGGGUGU UGGAAACCUC 55
 1501 ACCAUUUUCC CCCACCAAUG GAUCAACCUA CGCACCAAUA AUAGUGCUAC
 1551 AAUUGUGAUG CCAUACACCA ACAGUGUACC UAUGGAUAAC AUGUUUAGGC
 1601 AUAACAACGU CACCCUAAUG GUUAUCCAU UUGUACCGCU AGAUUACUGC 60

65

DE 39 39 200 A1

1651 CCUGGGUCCA CCACGUACGU CCCAAUUAACG GUCACGAUAG CCCCAAUGUG
 1701 UGCCGAGUAC AAUGGGUUAAC GUUUAGCAGG GCACCAGGGC UUACCAACCA
 5 1751 UGAAUACUCC GGGGAGCUGU CAAUUUCUGA CAUCAGACGA CUUCCAAUCA
 1801 CCAUCCGCCA UGCCGCAAUA UGACGUCACA CCAGAGAUGA GGAUACCUGG
 1851 UGAGGUGAAA AACUUGAUGG AAUAGCUGA GGUUGACUCA GUUGUCCCAG
 10 1901 UCCAAAAUGU UGGAGAGAAG GUCAACUCUA UGGAAGCAUA CCAGAUACCU
 1951 GUGAGAUCCA ACGAAGGAUC UGGAACGCAA GUAUUCGGCU UJCCACUGCA
 2001 ACCAGGGUAC UCGAGUGUUU UJAGUCGGAC GCUCCUAGGA GAGAUCUUGA
 15 2051 ACUAUUAUAC ACAUUGGUCA GGCAGCAUAA AGCUUACGUU UAUGUUCUGU
 2101 GGUUCGGCCA UGGCUACUGG AAAAUUCCUU UUGGCAUACU CACCACCAGG
 2151 UGCUGGAGCU CCUACAAAAA GGGUUGAUGC UAUGCUUGGU ACUCAUGUAA
 20 2201 UUUGGGACGU GGGGCUACAA UCAAGUUGCG UGCUGUGUAU ACCCUGGAUA
 2251 AGCCAAACAC ACUACCGGUU UGUUGCUUCA GAUGAGUAUA CCGCAGGGGG
 2301 UUUUAUUAACG UGCUGGUUUC AAACAAACAU AGUGGUCCCA GCGGAUGCCC
 2351 AAAGCUCCUG UUAUAUCAUG UGUUUCGUGU CAGCAUGCAA UGACUUCUCU
 2401 GUCAGGCUAU UGAAGGACAC UCCUUUCAUU UCGCAGCAA ACUUUUUCCA
 30 2451 GGGCCCAGUG GAAGACCGCA UAACAGCCGC UAUAGGGAGA GUUGCGGAUA
 2501 CCGUGGGUAC AGGGCCAACC AACUCAGAAG CUAUACCAGC ACUCACUGCU
 2551 GCUGAGACGG GUCACACGUC ACAAGUAGUG CCGGGUGACA CUAUGCAGAC
 35 2601 ACGCCACGUU AAGAACUACC AUUCAAGGUC CGAGUCAACC AUAGAGAACU
 2651 UCCUAUGUAG GUCAGCAUGC GUGUACUUUA CGGAGUAUAA AAACUCAGGU
 40 2701 GCCAAGCGGU AUGCUGAAUG GGUUUUAACA CCACGACAAG CAGCACAACU
 2751 UAGGAGAAAG CUAGAAUUCU UUACCUACGU CCGGUUCGAC CUGGAGCUGA
 2801 CGUUUGUCAU AACAAGUACU CAACAGCCCU CAACCACACA GAACCAAGAU
 45 2851 GCACAGAUCC UAACACACCA AAUUAUGUAU GUACCACCAG GUGGACCUGU
 2901 ACCAGAUAAA GUUGAUUCAU ACGUGUGGCA AACAUCUACG AAUCCCAGUG
 2951 UGUUUUGGAC CGAGGGAAC GCCCGCCGC GCAUGUCCAU ACCGUUUUG
 50 3001 AGCAUUGGCA ACGCCUAUUC AAAUUCUUAU GACGGAUGGU CUGAAUUUUC
 3051 CAGGAACGGA GUUUACGGCA UCAACACGCU AAACAACAUG GGCACGCUAU
 55 3101 AUGCAAGACA UGUCAACGCU GGAAGCACGG GUCCAUAUAA AAGCACCAUU
 3151 AGAAUUCUACU UCAAACCGAA GCAUGUCAA GCGUGGAUAC CUAGACCACC
 3201 UAGACUCUGC CAAUACGAGA AGGCAAAGAA CGUGAACUUC CAACCCAGCG
 60 3251 GAGUUACCAC UACUAGGCAA AGCAUCACUA CAAUGACAAA UACGGGCGCA
 3301 UUUGGACAAC AAUCAGGGGC AGUGUAUGUG GGAACUACA GGGUGGUAUA

DE 39 39 200 A1

3351	UAGACAUCUA GCUACCAGUG CUGACUGGCA AAACUGUGUG UGGGAAAGUU	
3401	ACAACAGAGA CCUCUAGUG AGCACGACCA CAGCACAUGG AUGUGAUUU	
3451	AUAGCCAGAU GUCAGUGCAC AACGGGAGUG UACUUUUGUG CGUCCAAAAA	5
3501	CAAGCACUAC CCAAUUUCGU UUGAAGGACC AGGUCUAGUA GAGGUCCAAG	
3551	AGAGUGAAUA CUACCCGAGG AGAUACCAAU CCCAUGUGCU UUUAGCAGCU	
3601	GGAUUUUCCG AACCAGGUGA CUGUGGCGGU AUCCUAAGGU GUGAGCAUGG	10
3651	UGUCAUUGGC AUUGUGACCA UGGGGGGUGA AGGCGUGGUC GGCUUUGCAG	
3701	ACAUCCGUGA UCUCUGUGG CUGGAAGAUG AUGCAAUGGA ACAGGGAGUG	
3751	AAGGACUAG UGGAACAGCU UGGAAAUGCA UUGGGUCCG GCUUUACUAA	15
3801	CCAAUAUUGU GAGCAAGUCA ACCUCCUGAA AGAAUCACUA GUGGGUCAAG	
3851	ACUCCAUCUU AGAGAAAUUCU CUAAAAGCCU UAGUUAAGAU AAUAUCAGCC	20
3901	UUACUAAUUG UGGUGAGGAA CCACGAUGAC CUGAUCACUG UGACUGCCAC	
3951	ACUAGCCCUU AUCGGUUGUA CCUCGUCCCC GUGGCGGUGG CUCAAACAGA	
4001	AGGUGUCACA AUAUUACGGA AUCCCUAUGG CUGAACGCCA AAACAAUAGC	25
4051	UGGCUUAAGA AAUUUACUGA AAUGACAAAU GCUUGCAAGG GUAUGGAAUG	
4101	GAUAGCUGUC AAAAUUCAGA AAUUCAUUGA AUGGCUCAA GUAAAAAUUU	
4151	UGCCAGAGGU CAGAGAAAAA CACGAGUUC UGAACAGACU UAAACAACUC	30
4201	CCCUUAUUG AAAGUCAGAU CGCCACAAUC GAGCAGAGCG CGCCAUCCCA	
4251	AAGUGACCAG GAACAAUUAU UUUCCAAUGU CCAAUACUUU GCCCACUAUU	35
4301	GCAGAAAGUA CGCUGCCUC UACGCAGCUG AAGCAAAGAG GGUGUUCUCC	
4351	CUUGAGAAGA AGAUGAGCAA UUACAUACAG UUCAAGUCCA AAUGCCGUUU	
4401	UGAACCUUGA UGUUUGCUCC UGCACGGGAG CCCUGGUGCC GGCAAGUCGG	40
4451	UGGCAACAAA CUUAAUUGGA AGGUGGCUUG CUGAGAAACU CAACAGCUCA	
4501	GUGUACUCAC UACCGCCAGA CCCAGAUCAC UUCGACGGAU ACAAACAGCA	
4551	GGCCGUGGUG AUUAUGGACG AUCUAUGCCA GAAUCCUGAU GGGAAAGACG	45
4601	UCUCCUUGUU CUGCCAAAUG GUUCCAGUG UAGAUUUUGU ACCACCCAUG	
4651	GCUGCCCUAG AAGAGAAAG CAUUCUGUUC ACCUCACCGU UUGUCUUGGC	50
4701	AUCGACCAAU GCAGGAUCUA UUAUUGCUCC AACCGUGUCA GAUAGCAGAG	
4751	CCUUGGCAAG GAGAUUUCAC UUUGACAUGA ACAUCGAGGU UAUUUCCAUG	
4801	UACAGUCAGA AUGGCAAGAU AAACAUGCCC AUGUCAGUCA AGACUUGUGA	55
4851	CGAUGAGUGU UGCCCCGUCA AUUUUAAAA GUGCUGCCCU CUUGUGUGUG	
4901	GGAAGGCUAU ACAAUUCAUU GAUAGAAGAA CACAGGUCAG AUACUCUCUA	
4951	GACAUGCUGA UCACCGAGAU GUUUAGGGAG UACAAUCAUA GACAUAGCGU	60
5001	GGGGACCACG CUUGAGGCAC UGUUCCAGGG ACCACCAGUA UACAGAGAGA	
5051	UCAAAAUUG CGUUGCACCA GAGACACCAC CACCGCCCGC CAUUGCGGAC	65

DE 39 39 200 A1

5101 C'YGCUCAAAU CGGUAGACAG UGAGGCUGUG AGGGAGUACU GCAAAGAAAA
5151 AGGAUGGUTUG GUUCCUGAGA UCAACUCCAC CCUCCAAAUTU GAGAAACAUG
5201 UCAGUCGGGC UUUCAUUUGC UUACAGGCAU UGACCACAUTU UGUGUCAGUG
5251 GCUGGAAUCA UAUUAUAAU AUUAAGCUC UUUUGCGGGUTU UUCAAGGUGC
5301 UUAUACAGGA GUGCCCAACC AGAAGCCCAG AGUGCCUACC CUGAGGCAAG
5351 CAAAAGUGCA AGGCCUGCC UUUAGAUUCG CCGUCGCAAU GAUGAAAAGG
5401 AACUCAAGCA CGGUGAAAAC UGAAUAUGGC GAGUUUACCA UGCUGGGCAU
5451 CUAUGACAGG UGGGCCGUTU UGCCACGCCA CGCCAAACCU GGGCCAACCA
5501 UCUUGAUGAA UGAUCAAGAG GUUGGUGUGC UAGAUGCCAA GGAGCUAGUA
5551 GACAAGGACG GCACCAACUTU AGAACUGACA CUACUCAAU UGAACCGGAA
5601 UGAGAAGUUC AGAGACAUCA GAGGCUUCUTU AGCCAAGGAG GAAGUGGAGG
5651 UUAUUGAGGC AGUGCUAGCA AUUAACACCA GCAAGUUUCC CAACAUGUAC
5701 AUUCCAGUAG GACAGGUCAC AGAAUACGGC UUCCUAAAACC UAGGUGGCAC
5751 ACCCACCAG AGAAUGCUUA UGUACAACUTU CCCCACAAGA GCAGGCCAGU
5801 GUGGUGGAGU GCUCAUGUCC ACCGGCAAGG UACUGGGUUAU CCAUGUUGGU
5851 GGAAUUGGCC AUCAGGGCUU CUCAGCAGCA CUCCUCAAAC ACUACUCAA
5901 UGAUGAGCAA GGUGAAUAG AAUUUAUUGA GAGCUCAAAG GACGCCGGGU
5951 UUCCAGUCAU CAACACACCA AGUAAAACAA AGUUGGAGCC UAGUGUUUUC
6001 CACCAGGUCU UUGAGGGGAA CAAAGAACCA GCAGUACUCA GGAGUGGGGA
6051 UCCACGUCUC AAGGCCAAUTU UUGAAGAGGC UAUUUUUUCC AAGUAUUAUAG
6101 GAAUUGUCA CACACACGUG CAUGAGUACA UGCUGGAAGC AGUGGACCAC
6151 UACGCAGGCC AACUAGCCAC CCUAGAUUUC AGCACUGAAC CAAUGAAACU
6201 GGAGGACGCA GUGUACGGUA CCGAGGGUCU UGAGGCGCUU GAUCUAACAA
6251 CGAGUGCCGG UUAACCAUUA GUUGCACUGG GUAUCAAGAA GAGGGACAUC
6301 CUCUCUAGA AGACUAAGGA CCUAACAAAG UUAAGGAAU GUAUGGACAA
6351 GUAUGGCCUG AACCUACCAA UGGUGACUUA UGUAAAAGAU GAGCUCAGGU
6401 CCAUAGAGAA GGUAGCGAAA GGAAAGUCUA GGCUGAUUGA GCGUCCAGU
6451 UUGAAUGAUTU CAGUGGCGAU GAGACAGACA UUGGUAAUC UGUACAAAAC
6501 UUUCCACCUA AACCAGGGG UUGUGACUGG UAGUGCUGUU GGGUGUGACC
6551 CAGACCUCU UUGGAGCAAG AUACCAGUGA UGUUAGAUGG ACAUCUCAUA
6601 GCAUUUGAUTU ACUCUGGGUA CGAUGCUAGC UUAAGCCCUG UCUGGUUUUGC
6651 UUGCCUAAAA AUGUUACUUG AGAAGCUUGG AUACACGCAC AAAGAGACAA
6701 ACUACAUUGA CUACUUGUGC AACUCCAUU ACCUGUACAG GGAUAAACAU
6751 UACUUUGUGA GGGGUGGCAU GCCCUCGGGA UGUUCUGGUA CCAGUAUUUU
6801 CAACUCAUUG AUUAACAAUA UCAUAAUUG GACACUAAUG CUAAAAGUGU
6851 ACAAAGGGAU UGACUUGGAC CAAUUCAGGA UGAUCGCAUA UGGUGAUGAU

6901 GUGAUCGCAU CGUACCCAUG GCCUAUAGAU GCAUCUTUAC UCGCUGAAGC
 6951 UGGUAAGGGU UACGGGCUGA UCAUGACACC AGCAGAUAAAG GGAGAGUGCU
 7001 UUAACGAAGU UACCUGGACC AACGCCACUU UCCUAAAGAG GUAUUUUAGA 5
 7051 GCAGAUGAAC AGUACCCCUU CCUGGUGCAU CCUGUUAUGC CCAUGAAAGA
 7101 CAUACACGAA UCAAUUAGAU GGACCAAGGA UCCAAAGAAC ACCCAAGAUC
 7151 ACGUGCGCUC ACUGUGUCUA UUAGCUUGGC AUAACGGGGA GCACGAAUUAU 10
 7201 GAGGAGUUGA UCCGUAAAAU UAGAAGCGUC CCAGUCGGAC GUUGUUUGAC
 7251 CCUCCCCGGG UUUUCAACUC UACGCAGGAA GUGGUUGGAC UCCUUUUAGA
 7301 UUAGAGACAA UUUGAAAUAA UUUAGAUGG CUUAACCCUA CUGUGCUAAC 15
 7351 CGAACCAGAU AACGGUACAG UAGGGGUAAA UUCUCCGCAU UCGGUGCGG

Besonders bevorzugte rekombinante DNAs enthalten erfindungsgemäß die Teilsequenz von Nukleotid 532 bis 2041, Nukleotid 2289 bis 3600, oder Nukleotid 6059 bis 7130 oder obengenannten Sequenz. 20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Mikroorganismen, welche eine erfindungsgemäße rekombinante DNA enthalten. Besonders bevorzugt sind hierbei die transformierten E. coli-Stämme VP4/2/3 (DSM 5558), VP1 und 3D^{Pol}. 25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, bei dem man das Polypeptid entweder aus einem der transformierten Mikroorganismen nach Aufschluß gewinnt oder eine erfindungsgemäße rekombinante DNA in geeignete Wirtszellen einbringt und das Polypeptid aus dem Kulturmedium, gegebenenfalls nach Aufschluß der Zellen, gewinnt. Vor allem bei Expression des Polypeptids in Eukaryonten erübrigt sich meist ein Zellaufschluß, da die Expressionsprodukte von den Zellen in das Kulturmedium abgegeben werden und hierdurch die Isolierung erleichtert wird. 30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen Polypeptide, vorzugsweise einem der Polypeptide VP4/2/3, VP1 oder der Polymerase zur Erzeugung von gruppenspezifischen polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern gegen Enteroviren. Hierzu müssen jedoch nicht unbedingt die vollständigen Polypeptide verwendet werden, solange mindestens eine der entsprechenden antigenen Determinanten auf einem unvollständigen Polypeptid vorhanden ist. 35

Die Möglichkeit, Infektionen durch einen Virus der gesamten Familie der Enteroviren spezifisch nachzuweisen, wird durch einen weiteren Gegenstand der Erfindung, nämlich den gruppenspezifischen immunologischen Nachweis von Enteroviren bzw. Antikörpern im Blut oder Serum von zu untersuchenden Patienten ermöglicht, bei dem man in einem an sich bekannten immunologischen Test, vorzugsweise einem ELISA, mindestens eines der erfindungsgemäßen Polypeptide als Antigen oder gegen diese Polypeptide erzeugte Antikörper einsetzt. Bei der erfindungsgemäßen gruppenspezifischen Nachweismethode sind alle dem Fachmann geläufigen immunologischen Testmethoden anwendbar, bei denen im Blut oder Serum von Patienten Antigene oder Antikörper nachgewiesen werden sollen. Beim Nachweis von Antigenen im Blut oder Serum werden Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt, die dann das im Blut oder Serum vorhandene Antigen binden. Zum Nachweis von Antikörpern im Blut oder Serum von Patienten können die Polypeptide selbst sowie die mit den Polypeptiden generierten Antikörper eingesetzt werden. Der Nachweis über markierte Antigene oder Antikörper und die praktische Durchführung des Tests, z. B. mit wandgebundenen Antikörpern, Antigenen etc., wird nach an sich bekannten Methoden durchgeführt. 40 45

Erfindungsgemäß wird es durch die Auffindung der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche für alle über 70 Serotypen von Enteroviren spezifische antigene Determinanten enthalten, erstmals ermöglicht, einen gruppenspezifischen Nachweis gegen die gesamte Familie der Enteroviren zu führen. Dies ermöglicht die rasche und sichere Serodiagnostik von Patienten mit klinischem Verdacht auf Enterovirus-Infektionen, z. B. Verdacht auf Myokarditis, Myositis, Meningitis, Encephalitis, Pancreatitis oder auch postvirales Fatigue-Syndrom. 50

Fig. 1 zeigt hierbei den Aufbau eines direkten ELISA, 55

Fig. 2 zeigt den eines Sandwich-ELISA.

Die folgenden Beispiele erläutern in Verbindung mit den Abbildungen die Erfindung weiter.

Beispiel 1

Herstellung der Polypeptide

Zur Expression von Coxsackie-Virus B3 (CVB3) wurden die transformierten E. coli-Stämme VP4/2/3, VP1, 3D^{Pol} verwendet. Jeweils 100 ml einer frischen Übernachtskultur wurden in 350 ml selektives LB-Medium (LB-Medium supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin) überimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 620 nm von 1,2 bis 2,0 wachsen gelassen. Danach wurde die Temperatur auf 42°C erhöht, indem 450 ml 56°C warmes Medium langsam und unter ständigem Schwenken zugegeben wurden. Die Expressionstemperatur wurde für eine Stunde beibehalten. Anschließend wurden die Bakterien bei 3500 g (40 Minuten, 4°C) pelletiert. Die Pellets 60 65

wurden zur Lyse der Bakterien in PBS⁻ (0,137 mmol/l NaCl, 3 mmol/l KCl, 6 mmol/l Na₂PO₄, 1 mmol/l KH₂PO₄), pH 7,2/1% SDS (Natriumdodecylsulfat) resuspendiert und 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Die so erhaltene klare, proteinhaltige Lösung konnte direkt auf Polyacrylamidgele aufgetragen werden. Für den Einsatz im ELISA war die SDS-Konzentration jedoch zu hoch, so daß SDS mit einem zweifachen molaren Überschuß an KCl ausgefällt wurde.

Beispiel 2

A) Isolation rekombinanter Proteine durch gelelektrophoretische Methoden

Das Bakterienzellysate wurde zur Auftrennung der Proteine auf ein vertikales Polyacrylamidgel (5%iges Sammelgel/13%iges Trenngel) aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli, 1970, Nature 227, S. 680—685). Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch eine Färbung mit Coomassie Blue sichtbar gemacht und anschließend distinkte virale Proteine präparativ rückisoliert. Dazu wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine aus dem Acrylamid im elektrischen Feld eluiert (Hunkapiller et al., 1983, Meth. Enzymol. 91, S. 227—236). Die Reinheit der gewonnenen Proteinproben wurde, nach Proteinbestimmung (W. Schaffner und C. Weissmann, (1973), A rapid, sensitive and spezific method for the determination of protein in dilute solution. Anal. Biochem. 56, 502—514) in einer analytischen, vertikalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.

B) Isolation und Reinigung viraler Antigene durch Affinitäts-Chromatographie

Zur Minimierung unspezifischer Reaktionen im ELISA wurden die viralen Antigene vor Gebrauch über eine Affinitätssäule gereinigt. Dazu wurden die polyklonalen Antiseren, (entweder aVP1 oder aVP4/2/3 oder a3D^{Pol}) an Bromcyan aktivierte Sepharose gekoppelt. Die viralen Antigene enthalten in einem Lysat CVB3 (Coxsackie-Virus B3) infizierter Verozellen, wurden in Bindungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 8,0) aufgenommen und mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,05 ml/min über die entsprechenden Säulen aufgetrennt. Die adsorbierten Antigene (VP1 oder PV4/2/3 oder 3D^{Pol}) wurden anschließend mit derselben Flußgeschwindigkeit und einem Eluierungspuffer (100 mM Glycin, pH 2,7) von den gebundenen Antikörpern getrennt und in einem Eppendorfgefäß mit 0,5 M Carbonatpuffer aufgefangen. Zur Stabilisierung der Proben wurden diese anschließend über PD-10-Säulen (Pharmacia) in PBS⁻ umgepuffert.

Beispiel 3

Reinigung der rekombinanten Proteine über eine Hydroxylapatit-Säule

Proteinproben, die zur Immunisierung verwendet werden, sollten keine zu hohe Konzentration an Detergentien, wie z. B. SDS oder NP40, enthalten, da dies für das Versuchstier tödlich sein kann. Deshalb wurden die Proben mit Hilfe einer Hydroxylapatit-Säule (G. Bernadi, Meth. Enzymol. 22 (1971) 325—339) von diesen Detergentien weitgehend befreit. Die Bindung der Proteine an die Matrix erfolgte in einem 0,01-mol/l-Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8). Im zweiten Schritt wurde das Detergens herausgewaschen, in dem 4 bis 5 Säulenvolumen desselben Puffers über die Säule gegeben wurden. Im letzten Schritt wurde dann das Protein mit einem 0,5-mol/l-Na-Phosphat-Puffer (pH 6,8) eluiert.

Beispiel 4

Generierung monoklonaler Antikörper und polyklonaler Antiseren

— Balb/c-Mäuse —

Zur Generierung monoklonaler Antikörper wurden ca. 6 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse nach folgendem Immunisierungsschema mit CVB3 infiziertem Verozell-Lysat immunisiert.

Tag	Proteindosis (µg) gelöst in:	CFA	IFA	PBS
1	Priming 150 µg	•		
21	Auffrischung 50 µg		•	
35	Auffrischung 50 µg		•	
50	Auffrischung 50 µg			•
51	Boost 20 µg			•
52	Boost 20 µg			•
53	Boost 20 µg			•

CFA = komplettes Freund'sches Adjuvans
IFA = inkomplettes Freund'sches Adjuvans
PBS = phosphatgepufferte Salzlösung

Für die einzelnen Immunisierungsschritte wurde die entsprechende Proteinmenge in den jeweiligen Zusätzen

emulgiert, 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach den Mäusen i. p. injiziert. Zur Überprüfung der Immunantwort wurde nach der ersten und zweiten Auffrischung den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und der Antikörpertiter des Serums gegen die rekombinanten CVB3-Proteine (VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}) im ELISA (siehe Beispiel 5A) bestimmt. Die Fusion der Immunglobulin-produzierenden Milzzellen der nach obigem Schema immunisierten Mäuse und der Maus-Myelom Permanentzelllinie X63/Ag8.653 wurde nach der von G. Köhler und C. Milstein 1975 beschriebenen Methode durchgeführt (Nature 256, 495–497). Es schloß sich eine 14tägige Selektion durch HAT-Medium an, die sicherstellt, daß nur durch die Fusion entstandene Zellklone überleben. Die so erhaltenen Zellklone wurden nach der "Limiting Dilution" zweimal subkloniert. Die Zellklone, die spezifische Antikörper gegen CVB3-Proteine produzieren, wurden weiter kultiviert und einmal wöchentlich das Medium zu 2/3 abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Der abgenommene Zellüberstand wurde 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert und der klare Überstand bei –20°C eingefroren. In diesem Überstand sind ca. 5 bis 20 µg/ml monoklonale Antikörper enthalten, so daß sie 1 : 10 verdünnt im ELISA eingesetzt werden können.

– Kaninchen –

Zur Generierung der polyklonalen Antisera wurden drei verschiedene, je sechs Monate alte weibliche Neuseeland-Kaninchen mit in E. coli exprimierten, aufgereinigten CVB3-Proteinen (entweder VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}) nach folgendem Schema immunisiert:

Tag	Proteindosis (µg) in:	CFA	IFA	PBS
1	Priming 150 µg	*		
13	Auffrischung 75 µg		*	
36	Auffrischung 75 µg		*	
64	Auffrischung 75 µg			*

alle 3 Monate eine weitere Auffrischung mit 75 µg Protein in PBS.

Vor jeder Auffrischung wurde dem Kaninchen 5 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und der jeweilige anti-CVB3-Protein-Antikörpertiter im ELISA bestimmt. 64 Tage nach der Erstimmunisierung war der Antikörpertiter so weit gestiegen, daß dem Kaninchen in vierwöchigen Abständen 20 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen werden konnte. Nach erfolgter Blutgerinnung bei Raumtemperatur wurde das Serum durch eine 10minütige Zentrifugation bei 300 g gewonnen, anschließend aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt.

Beispiel 5

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Im ELISA lassen sich Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen messen. Das Prinzip beruht darauf, daß entweder das Antigen an die Festphase gebunden, angeboten wird und dann der Antikörper bzw. die Existenz von Antikörpern in einem Serum gemessen wird, oder die Antikörper an die Festphase gebunden, angeboten werden und somit die Konzentration von Antigenen in einem Serum gemessen werden können.

Allgemein differenziert man zwischen zwei ELISA-Formen, dem direkten ELISA (siehe Fig. 1), hierbei wird das Substrat (entweder Antigen oder Antikörper) direkt an die Festphase gebunden und dem Sandwich ELISA (siehe Fig. 2). Bei diesem Prinzip wird das Antigen von einem Antikörper gebunden frei im Raum und in nativer Form präsentiert. Dies führt zu einer erheblichen Sensitivitätssteigerung des Testsystems (Moudalal et al., 1984, J. Immunol. Meth. 68, S. 35–43).

Lösungen:

Beschichtungspuffer: 100 mM Carbonatpuffer, pH 9,6

Absättigungslösung: 0,5% BSA (Rinderserumalbumin) in PBS-

Waschlösung: 1,5 M NaCl, 20% Tween 20

Substratlösung:

a) 10% Diethanolpuffer: 97 ml 1 M Diethanolamin, 100 mg MgCl₂ × 6 H₂O mit 1 M NaCl pH 9,8 einstellen ad 1000 ml H₂O-bidest.

b) PNPP(p-Nitro-phenyl-phosphat) in Diethanolpuffer lösen mit einer Konzentration von 1 mg/ml Stopp-Lösung: 3 M NaOH.

A) Direkter ELISA

Nachweis von enteroviralen Antikörpern in human Seren (Fig. 1)

Eines der viralen Antigene (VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}), gewonnen und gereinigt aus infizierten Vero-Zellsäcken (siehe Beispiel 2B) wurde in einer Konzentration von 300 ng/100 µl/Well (Vertiefung einer Plastik-Mikroti-

terplatte in Beschichtungspuffer verdünnt und bei 4°C inkubiert. Es folgt ein einmaliges Waschen mit der Waschlösung. Zur Absättigung freier Bindungsstellen der Plastikoberfläche wurden 200 µl Absättigungslösung/Well für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschlösung wurde das zu untersuchende Patientenserum in einer 1 : 10-Verdünnung (in PBS⁻ in einem Volumen von 100 µl für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgt ein dreimaliges Waschen mit der Waschlösung. Zum Nachweis der an CVB-Antigen gebundenen humanen Antikörper wird ein anti-human Immunglobulin-Konjugat mit der alkalischen Phosphatase (AP-Konjugat) in einem Volumen von 100 µl für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung wurden 100 µl PNPP-Substratlösung für 30 bis 60 Minuten bei 37°C im Dunklen inkubiert, anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung gestoppt und die Extinktion bei einer optischen Dichte von 405 nm (OD_{405 nm}) gemessen.

Nachweis von enteroviralem Antigen in human Seren (Fig. 1)

Alle Waschschritte erfolgten analog dem oben beschriebenen Schemata. Die Patientenserum wurden 1 : 10 in Beschichtungspuffer verdünnt und für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Zur Absättigung freier Bindungsstellen der Plastikoberfläche wurden 200 µl Absättigungslösung/Well für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Inkubation mit Enterovirus-spezifischen polyklonalen Antiseren (aVP1 oder aVP4/2/3 oder a3D^{Pol}) 1 : 500 verdünnt in PBS⁻ für 2 Stunden bei 37°C. Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch eine einstündige Inkubation bei 37°C mit einem AP-Konjugat anti-Kaninchen-Immunglobulin in einem Volumen von 100 µl nachgewiesen. Zuletzt wurden 100 µl PNPP-Substratlösung für 30 bis 60 Minuten bei 37°C im Dunklen inkubiert, die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung gestoppt und die Extinktion bei einer OD_{405 nm} gemessen.

B) Sandwich ELISA (Fig. 2)

Als erste Komponente wurde eines der Affinitäts-gereinigten polyklonalen und Enterovirus-spezifischen Antiseren (aVP1 oder aVP4/2/3 oder a3D^{Pol}) in einer Konzentration von 300 ng/100 µl/Well an die Plastikoberfläche gebunden (18 Stunden bei 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit Waschlösung wurde das entsprechende aufgereinigte Antigen aus infizierten Verozell-Lysaten (siehe Beispiel 2B) (VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}) in einer Konzentration von 300 ng/100 µl/Well für 3 Stunden bei 37°C vorgelegt. Es schließen sich zwei Waschschritte an, bevor das 1 : 10 in PBS verdünnte Patientenserum für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Nachdem dreimal gewaschen wurde, wurde das "Immun-Sandwich" bestehend aus polyklonalem Antikörper (Festphasenkomponente), Antigen und humanem Antikörper mit einem AP-Konjugat anti-human Immunglobulin nachgewiesen, durch eine einstündige Inkubation der entsprechenden Konjugatlösung. Vor der Substratreaktion wurde wiederum dreimal gewaschen, 100 µl Substratlösung zugegeben und nach 30 bis 60 Minuten Inkubation bei 37°C im Dunklen die Enzymreaktion mit 100 µl Stopp-Lösung abgebrochen. Zuletzt wurde wiederum die Extinktion bei einer OD_{405 nm} gemessen.

Beispiel 6

Immunoblot (Western-Blot)

Die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennten, affinitätschromatographisch gereinigten viralen Antigene (VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}) wurden mittels Elektro-Blotting (Semi-dry) auf Nitrocellulose transferiert. Der Nachweis dieser Antigene erfolgt durch eine spezifische Antikörperreaktion und nachfolgender enzymatischer Farbreaktion (Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. 76, S. 4350—4354), wodurch die humanen Antikörper (aus Patientenserum) spezifisch charakterisiert werden.

Lösungen:

Lösung I:
25 mM Tris/HCl, pH 8,0
76 mM NaCl
0,5% Gelatine
2,5% BSA
0,003% NP40

Lösung II:
50 mM Tris/HCl, pH 8,0
15 mM NaCl
0,25% Gelatine
0,1% BSA
0,025% NP40

Antikörperlösung:
50 mM Tris/HCl, pH 8,0
15 mM NaCl
0,25% Gelatine

3,0% BSA
0,025% NP40

Substratlösung:

100 mM Tris/HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

400 µM NBT in 70% Dimethylformamid

400 µM BCIP in 100% Dimethylformamid

NBT = Nitro-Blue-tetrazolium

BCIP = 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat

Nach erfolgter SDS-PAGE der viralen Antigene VP01, VP4/2/3, 3D^{Pol} wurde auf der Kathode der Semi-Dry Apparatur das Polyacrylamidgel mit dem Nitrocellulosefilter (NC-Filter) als Sandwich zwischen jeweils drei Schichten Whatman 3-MM-Filterpapier aufgebaut. Die obere Graphitplatte (= Anode) wurde aufgesetzt und der Transfer mit einer konstanten Stromstärke von 150 mA über eine Zeitspanne von 90 Minuten durchgeführt.

Als Vorbereitung der Immunreaktion wurden die noch freien Proteinbindungsstellen der NC durch zweimal 10 Minuten Schwenken in Lösung I abgesättigt. Das Patientenserum wurde 1 : 20 in Antikörperlösung verdünnt und eine Stunde mit dem Filter inkubiert. Zum Entfernen der nicht oder unspezifisch gebundenen Antikörper wurde die NC dreimal 15 Minuten in Lösung II geschwenkt. Der zweite Antikörper, ein AP-anti-human-Immunglobulin-Konjugat 1 : 500 verdünnt in Antikörperlösung, wurde ebenfalls für eine Stunde mit dem NC-Filter inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit Lösung II für jeweils 15 Minuten. Vor der Farbreaktion wurde der Filter zwischen 3-MM-Whatmanpapier getrocknet. Es schloß sich eine Inkubation der NC in der Substratlösung für 5 bis 15 Minuten an, danach wurde die Enzymreaktion durch sechsmal Waschen des Filters mit destilliertem Wasser gestoppt. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Durch die Charakterisierung der humanen Antiseren im Western-Blot konnte gezeigt werden, daß tatsächlich ein entsprechendes Protein mit dem richtigen Molekulargewicht vom Antiserum erkannt wird.

Patentansprüche

1. Polypeptid, **gekennzeichnet durch** die folgende Aminosäuresequenz

DE 39 39 200 A1

MGAQVSTQ KTGAEHETRLN ASGNSIIHYT NINYKDAAS NSANRQDFTQ
 DPGKFTEPVK DIMIKSLPAL NSPTVEECGY SDRARSITLG NSTITTQECA
 5 NVVVGYGVWP DYLDKSEATA EDQPTQPDVA TCRFYTLDSV QWQKTSPGWW
 WKLPDALSNI GLFGQNMQYH YLGRGTGYTVH VQCNASKFHQ GCLLVVCVPE
 AEMGCATLDN TPSSAELLGG DTAKEFADKP VASGSNKLQV RRVYNAGMGV
 10 GVGNLITIFPH QWINLRTNNS ATIVMPYTNS VPMDNMFRHN NVTLMVIPFV
 PLDYCPGSTT YVPITVTIAP MCAEYNGLRL AGHQGLPTMN TPGSCQFLTS
 DDFQSPSAMP QYDVTPEMRI PGEVKNLMEI AEVDSVVPVQ NVGEKVNSME
 15 AYQIPVRSNE GSGTQVFGFP LQPGYSSVFS RTLLGEILNY YTHWSGSIKL
 TFMFCGSAMA TGKFLLAYSP PGAGAPTKRV DAMLGTHVIW DVGLQSSCVL
 CIPWISQTHY RFVASDEYTA GGFITCWYQT NIVVPADAQS SCYIMCFVSA
 20 CNDFSVRLLK DTPFISQQNF FQGPVEDAIT AAIGRVADTV GTGPTNSEAI
 PALTAAETGH TSQVVPDGT M QTRHVKNYHS RSESTIENFL CRSACVYFTE
 YKNSGAKRYA EWLTPRQAA QLRRKLEFFT YVRFDELETF VITSTQPST
 25 TQNQDAQILT HQIMYVPPGG PVPDKVDSYV WQTSTNPSVF WTEGNAPPRM
 SIPFLSIGNA YSNFYDGWSE FSRNGVYGIN TLNNMGTLYA RNVNAGSTGP
 30 IKSTIRIYFK PKHVKAWIPR PPRLCQYEKA KNVNFQPSGV TTTRQSITTM
 TNTGAFGQQS GAVYVGNYRV VNRHLATSAD WQNCVWESYN RDLLVSTTTA
 HGCDIIARCQ CTTGVYFCAS KNKHYPISFE GPGLVEVQES EYYPRRYQSH
 35 VLLAAGFSEP GDCGGILRCE HGVIGIVTMG GEGVVGFADI RDLLWLEDDA
 MEQGVKDYVE QLGNAFGSGF TNQICEQVNL LKESLVGQDS ILEKSLKALV
 40 KIISALVIVV RNHDDLITVT ATLALIGCTS SPWRWLKQKV SQYYGIPMAE
 RQNNWLKKEF TEMTNACKGM EWIAVKIQKF IEWLKVKILP EVREKHEFLN
 RLKQLPLLES QIATIEQSAP SQSDQEQLFS NVQYFAHYCR KYAPLYAAEA
 45 KRVFSLEKKM SNYIQFKSKC RIEPVCLLLH GSPGAGKSV A TNLIGRSLAE
 KLNSSVYSLP PDPDHFDPGYK QQAVVIMDDL CQNPDKGDVS LFCQMVSVD
 FVPPMAALEE KGILFTSPFV LASTNAGSIN APTVSDSRAL ARRFHFDMMI
 50 EVISMYSQNG KINMPMSVKT CDDECCPVNF KKCCPLVCGK AIQFIDRRTO
 VRYSLDMLVT EMFREYNHRH SVGTTLLEALF QGPPVYREIK ISVAPETPPP

PAIADLLKSV DSEAVREYCK EKGWLVPEIN STLQIEKHVS RAFICLQALT
 TFSVAGIIY IYKLFAGFQ GAYTGVPNQK PRVPTLRQAK VQGPAFEFAV
 AMMKRNSSTV KTEYGFTML GIYDRWAVLP RHAKPGPTIL MNDQEVGVLD 5
 AKELVDKDG T NLELTLLKLN RNEKFRDIRG FLAKEEVEVN EAVLAINTSK
 FPNMYIPVGQ VTEYGFLNLG GTPTKRMLMY NFPTRAGQCG GVLMTSGKVL
 GIHVGGNGHQ GFSAALLKHY FNDEQGEIEF IESSKDAGFP VINTPSKTKL 10
 EPSVFHQVFE GNKEPAVLRS GDPRLKANFE EAIFSKYIGN VNTHVDEYML
 EAVDHYAGQL ATLDISTEPM KLEDAVYGTE GLEALDLTTS AGYPYVALGI
 KKRDLISKKT KDLTKLKECM DKYGLNLP MV TYVKDELRSI EKVAKGFSRL 15
 IEASSLNDSV AMRQTFGNLY KTFHLNPGVV TGSAVGCDPD LFWSKIFVML
 DGHIAFDYS GYDASLSPVW FACLKMLLEK LGYTHKETNY IDYLCNSHHL 20
 YRDKHYFVRG GMPSGCSGTS IFNSMINNII IRTLMLKVYK GIDLQFRMI
 AYGDDVIASY PWPIDASLLA EAGKGYGLIM TPADKGECFN EVTWTNATFL
 KRYFRADEQY PFLVHPVMPM KDIHESIRWT KDPKNTQDHV RSLCLLAWHN 25
 GEHEYEEFIR KIRSVPGRC LTLPAFSTLR RKWLDSF

2. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die im folgenden angegebene Teilsequenz der Sequenz von Anspruch 1 enthält (VP4/2/3).

AQVSTQ KTGAHETRLN ASGNSIIHYT NINYYKDAAS NSANRQDFTQ 35
 DPGKFTEPVK DIMIKSLPAL NSPTVEECGY SDRARSITLG NSTITTQECA
 NVVVGYGWVP DYKLDSEATA EDQPTQPDVA TCRFYTLDSV QWQKTS PGWW
 WKLPDALS NL GLFGQNMQYH YLGRTGYTVH VQCNA SKFHQ GCLLVVCVPE 40
 AEMGCATLDN TPSSAELLGG DTAKEFADKP VASGSNKL VQ RVVYNAGMGV
 GVGNTLIFPH QWINLRTNNS ATIVMPYTNS VPMDNMFRHN NVTLMVIPFV
 PLDYCPGSTT YVPITVTIAP MCAEYNGRL AGHQGLPTMN TPGSCQFLTS 45
 DDFQSPSAMP QYDVTPEMRI PGEVKNLMEI AEVDSVVPVQ NVGEKVNSME
 AYQIPVRSNE GSGTQVFGFP LQPGYSSVFS RTLLGEILNY YTHWSGSI 50

3. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die im folgenden angegebene Teilsequenz der Sequenz von Anspruch 1 enthält (VP1).

DE 39 39 200 A1

SDEYTA GGFITCWYQT NIVVPADAQS SCYIMCFVSA
 CNDFSVRLLK DTPFISQQNF FQGPVEDAIT AAIGRVADTV GTGPTNSEAI
 5 PALTAAETGH TSQVVPGDTM QTRHVKNYHS RSESTIENFL CRSACVYFTE
 YKNSGAKRYA EWLTPRQAA QLRRKLEFFT YVRFDLELTF VITSTQQPST
 TQNQDAQILT HQIMYVPPGG PVPDKVDSYV WQTSTNPSVF WTEGNAPPRM
 10 SLPFLSIGNA YSNFYDGWSE FSRNGVYGIN TLNNMGTLYA RNVNAGSTGP
 IKSTIRIYFK PKHVKAWIPR PPRLCQYEKA KNVNFQPSGV TTTRQSITTM
 TNTGAFGQQS GAVYVGNYRV VNRHLATSAD WQNCVWESYN RDLLVSTTTA
 15 HGCDIIARCQ CTTGVYFCAS KNKHYPISFE GPGLVEVQES EYYPARRYQSH
 VL

4. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die im folgenden angegebene Teilsequenz der Sequenz von Anspruch 1 enthält (3D^{Pol}).

RS GDPRLKANFE EAIFSKYIGN VNTHVDEYML
 EAVDHYAGQL ATLDISTEPM KLEDAVYGTE GLEALDLTTS AGYPYVALGI
 KKRDIILSKKT KDLTKLKECM DKYGLNLPV TYVKDELRSI EKVAKGKSRL
 30 IEASSLNDV AMRQTFGNLY KTFHLNPGVV TGSAVGCDPD LFWSKIPVML
 DGHLLAFDYS GYDASLSPVW FACLKMLLEK LGYTHKETNY IDYLCNSHHL
 YRDKHYFVRG GMPSGCSGTS IFNSMINNII IRTLMKVVYK GIDLQFRMI
 35 AYGDDVIASY PWPIDASLLA EAGKCYGLIM TPADKGECFN EVTWTNATFL
 KRYFRADEQY PFLVHPVMPM KDIHESIRW

5. Polypeptid dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine der auf den Polypeptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthaltenen antigenen Determinanten enthält.

6. Rekombinante DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert, einligiert in einen Expressionsvektor enthält.

7. Rekombinante DNA nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die folgende Sequenz enthält:

DE 39 39 200 A1

1	UUAAAACAGC CUGUGGGUUG AUCCCACCCA CAGGCCCAUU GGGCGCUAGC	
51	ACUCUGGUU AU CACGGUACCU UUGUGCGCCU GUUUUAUACC CCCUCCCCCA	
101	ACUGUAACUU AGAAGUAACA CACACCGAUC AACAGUCAGC GUGGCACACC	5
151	AGCCACGUUU UGAUCAAGCA CUUCUGUUAC CCCGGACUGA GUAUCAAUAG	
201	ACUGCUCACG CGGUUGAAGG AGAAAGCGUU CGUUAUCCGG CCAACUACUU	
251	CGAAAAACCU AGUAACACCG UGGAAGUUGC AGAGUGUUUC GCUCAGCACU	10
301	ACCCACAGUU AGAUCAGGUC GAUGAGUCAC CGCAUUCCCC ACGGGCGACC	
351	GUGGCGGUGG CUGCGUUGGC GGCCUGCCCA UGGGGAAACC CAUGGGACGC	
401	UCUAAUACAG ACAUGGUGCG AAGAGUCUUA UGAGCUAGUU GGUAGUCCUC	15
451	CGGCCCCUGA AUGCGGCUAA UCCUACUGC GGAGCACACA CCCUCAAGCC	
501	AGAGGGCAGU GUGUCGUAAAC GGGCAACUCU GCAGCGGAAC CGACUACUUU	20
551	GGGUGUCCGU GUUUCAUUUU AUUCCUAUAC UGGCUGCUUA UGGUGACAAU	
601	UGAGAGAUCG UUACCAUAUA GCUAUUGGAU UGGCCAUCCG GUGACUAAUA	
651	GAGCUAUUAU AUAUCCCUUU GUUGGGUUUA UACCACUUAG CUUGAAAGAG	25
701	GUUAAAACAU UACAAUUCAU UGUUAAGUUG AAUACAGCAA AAUGGGAGCU	
751	CAAGUAUCAA CGCAAAAGAC UGGGGCACAU GAGACCAGGC UGAAUGCUAG	
801	CGGCAAUUC AUCAUUCACU ACACAAUAU UAAUUAUUAC AAGGAUGCCG	30
851	CAUCCAACUC AGCCAAUCGG CAGGAUUUCA CUCAAGACCC GGGCAAGUUC	
901	ACAGAACCAG UGAAAGAUAU CAUGAUUAAA UCACUACCAG CUCUCAACUC	35
951	CCCCACAGUA GAGGAGUGCG GAUACAGUGA CAGGGCGAGA UCAAUCACAU	
		40
		45
		50
		55
		60
		65

DE 39 39 200 A1

1001 UAGGUAACUC CACCAUAACG ACUCAGGAU GCGCCAACGU GGUGGUGGGC
 1051 UAUGGAGUAU GGCCAGAUUA UCUAAAGGAU AGUGAGGCAA CAGCAGAGGA
 5 1101 CCAACCGACC CAACCAGACG UUGCCACAUG UAGGUTCUAU ACCCUUGACU
 1151 CYGUGCAAUG GCAGAAAACC UCACCAGGAU GGUGGUGGAA GCUGCCCCAU
 1201 GCUUUGUCGA ACUUAGGACU GUUUGGGCAG AACAUGCAGU ACCACUACUU
 10 1251 AGGCCGAACU GGGUAUACCG UACAUGUGCA GUGCAAUGCA UCUAAGUUCC
 1301 ACCAAGGAUG CUUGCUAGUA GUGUGUGUAC CGGAAGCUGA GAUGGGUUGC
 1351 GCAACGCUAG ACAACACCCC AUCCAGUGCA GAAUUGCUGG GGGGCGAUAC
 15 1401 GGCAAAGGAG UUGCGGACA AACC GGUCG AUCCGGGUCC AACAAGUUGG
 1451 UACAGAGGGU GGUGUAUAU GCAGGCAUGG GGGUGGGUGU UGGAAACCUC
 1501 ACCAUUUUCC CCCACCAUG GAUCAACCUA CGCACCAUA AUAGUGCUAC
 20 1551 AAUUGUGAUG CCAUACACCA ACAGUGUACC UAUGGAUAAC AUGUUUAGGC
 1601 AUAACAACGU CACCCUAUG GUUAUCCAU UUGUACCGCU AGAUUACUGC
 25 1651 CCUGGGUCCA CCACGUACGU CCCAAUACG GUCACGAUAG CCCCAAUGUG
 1701 UGCCGAGUAC AAUGGGUUAC GUUUAGCAGG GCACCAGGGC UUACCAACCA
 1751 UGAUACUCC GGGGAGCUGU CAAUUCUGA CAUCAGACGA CUUCCAAUCA
 30 1801 CCAUCCGCCA UGCCGCAUA UGACGUCACA CCAGAGAUGA GGAUACCUGG
 1851 UGAGGUGAAA AACUUGAUGG AAUAGCUGA GGUUGACUCA GUUGUCCAG
 35 1901 UCCAAAAUGU UGGAGAGAAG GUCAACUCUA UGGAAGCAUA CCAGAUACCU
 1951 GUGAGAUCCA ACGAAGGAUC UGGAACGCAA GUAUUCGGCU UUCCACUGCA
 2001 ACCAGGGUAC UCGAGUGUUU UUAGUCGGAC GCUCCUAGGA GAGAUCUUGA
 40 2051 ACUAUUUAC ACAUUGGUA GGCAGCAUA AGCUUACGUU UAUGUUCUGU
 2101 GGUUCGGCCA UGGCUACUGG AAAAUUCCUU UUGGCAUACU CACCACCAGG
 2151 UGCUGGAGCU CCUACAAAAA GGGUUGAUGC UAUGCUGGU ACUCAUGUAA
 45 2201 UUUUGGACGU GGGGCUACAA UCAAGUUGCG UGCUGUGUAU ACCCUGGAUA
 2251 AGCCAAACAC ACUACCGGUU UGUUGCUUCA GAUGAGUAUA CCGCAGGGGG
 50 2301 UUUUAUUACG UGCUGGUAUC AAACAAACAU AGUGGUCCCA GCGGAUGCCC
 2351 AAAGCUCCUG UUACAUCAUG UGUUUCGUGU CAGCAUGCAA UGACUUCUCU
 2401 GUCAGGCUAU UGAAGGACAC UCCUUUCAUU UCGCAGCAA ACUUUUUCCA
 55 2451 GGGCCCAGUG GAAGACGCGA UAACAGCCGC UAUAGGGAGA GUUGCGGAUA
 2501 CCGUGGGUAC AGGGCCAACC AACUCAGAAG CUAUACCAGC ACUCACUGCU
 2551 GCUGAGACGG GUCACACGUC ACAAGUAGUG CCGGGUGACA CUAUGCAGAC
 60 2601 ACGCCACGUU AAGAACUACC AUUCAAGGUC CGAGUCAACC AUAGAGAAU
 2651 UCCUAUGUAG GUCAGCAUGC GUGUACUUUA CGGAGUAUA AAACUCAGGU

DE 39 39 200 A1

2701 GCCAAGCGGU AUGCUGAAUG GGUUAUUAACA CCACGACAAG CAGCACAACU
 2751 UAGGAGAAAG CUAGAAUUCU UUACCUACGU CCGGUUCGAC CUGGAGCUGA
 2801 CGUUTUGUCAU AACAAGUACU CAACAGCCCU CAACCACACA GAACCAAGAU 5
 2851 GCACAGAUCC UAACACACCA AAUUAUGUUAU GUACCACCAG GUGGACCUGU
 2901 ACCAGAUAAA GUUGAUUCAU ACGUGUGGCA AACAUUCUACG AAUCCCAGUG
 2951 UGUUUUGGAC CGAGGGAAAC GCCCCGCCGC GCAUGUCCAU ACCGUUUUUG 10
 3001 AGCAUUGGCA ACGCCUAUUC AAAUUCUUAU GACGGAUGGU CUGAAUUUUC
 3051 CAGGAACGGA GUUUACGGCA UCAACACGCU AAACAACAUG GGCACGCUAU
 3101 AUGCAAGACA UGUCAACGCU GGAAGCACGG GUCCAUAUAA AAGCACCAUU 15
 3151 ACAAUCUACU UCAAACCGAA GCAUGUCAA GCGUGGAUAC CUAGACCACC
 3201 UAGACUCUGC CAUACGAGA AGGCAAAGAA CGUGAACUUC CAACCCAGCG 20
 3251 GAGUUACCAC UACUAGGCAA AGCAUCACUA CAAUGACAAA UACGGGCGCA
 3301 UUUUGGACAAC AAUCAGGGGC AGUGUAUGUG GGAACUACA GCGUGGUAAA
 3351 UAGACAUCUA GCUACCAGUG CUGACUGGCA AAACUGUGUG UGGGAAAGUU 25
 3401 ACAACAGAGA CCUCUUAUG AGCACGACCA CAGCACAUGG AUGUGAUUU
 3451 AUAGCCAGAU GUCAGUGCAC AACGGGAGUG UACUUUUGUG CGUCCAAAAA
 3501 CAAGCACUAC CCAAUUUCGU UUGAAGGACC AGGUCUAGUA GAGGUCCAAG 30
 3551 AGAGUGAAUA CUACCCAGG AGAUACCAU CCAUGUGCU UUUAGCAGCU
 3601 GGAUUUUCG AACCAGGUGA CUGUGGCGGU AUCCUAAGGU GUGAGCAUGG
 3651 UGUCAUUGGC AUUGUGACCA UGGGGGUGA AGGCGUGGUC GGUUUUGCAG 35
 3701 ACAUCCGUGA UCUCUGUGG CUGGAAGAUG AUGCAAUGGA ACAGGGAGUG
 3751 AAGGACUAUG UGGAACAGCU UGGAUUGCA UUCGGCUCG GCUUACUAA 40
 3801 CCAAUAUGU GAGCAAGUCA ACCUCCUGAA AGAAUCACUA GUGGGUCAAG
 3851 ACUCCAUCUU AGAGAAUUCU CUAUAGCCU UAGUUAAGAU AAUAUCAGCC
 3901 UUAGUAAUUG UGGUGAGGAA CCACGAUGAC CUGAUCACUG UGACUGCCAC 45
 3951 ACUAGCCCUU AUCGGUUGUA CCUCGUCCCC GUGGCGGUGG CUCAAACAGA
 4001 AGGUGUCACA AUAUUACGGA AUCCUAUGG CUGAACGCCA AAACAUAAGC 50
 4051 UGGCUUAAGA AAUUUACUGA AAUGACAAU GCUUGCAAGG GUAUGGAAUG
 4101 GAUAGCUGUC AAAAUUCAGA AAUUCAUUGA AUGGCUCAA GUAAAAAUUU
 4151 UGCCAGAGGU CAGAGAAAAA CACGAGUUC UGAACAGACU UAAACAACUC 55
 4201 CCCUUAUUAG AAAGUCAGAU CGCCACAAUC GAGCAGAGCG CGCCAUCCCA
 4251 AAGUGACCAG GAACAAUUAU UUUCCAAUGU CCAAUACUUU GCCCACUAUU
 4301 GCAGAAAGUA CGCUCUCCUC UACGCAGCUG AAGCAAAGAG GGUGUUCUCC 60
 4351 CUUGAGAAGA AGAUGAGCAA UUAUACUACG UUCAAGUCCA AAUGCCGUUU

65

DE 39 39 200 A1

4401 UGAACCUGUA UGUUUGCUCC UGCACGGGAG CCCUGGUGCC GGCAAGUCGG
 4451 UGGCAACAAA CUUAAUUGGA AGGUCGCUUG CUGAGAAACU CAACAGCUCA
 5 4501 GUGUACUCAC UACCGCCAGA CCCAGAUCAU UUCGACGGAU ACAAACAGCA
 4551 GGCCGUGGUG AUUAUGGACG AUCUAUGCCA GAAUCCUGAU GGGAAAGACG
 4601 UCUCUUGUUG CUGCCAAAUG GUUUCAGUG UAGAUTUUGU ACCACCCAUG
 10 4651 GCUGCCCUAG AAGAGAAAGG CAUUCUGUUC ACCUCACCGU UTUGUCUUGGC
 4701 AUCGACCAAU GCAGGAUCUA UUAUUGCUCC AACCGUGUCA GAUAGCAGAG
 4751 CCUUGGCAAG GAGAUTUCAC UUGACAUGA ACAUCGAGGU UAUUUGCAUG
 15 4801 UACAGUCAGA AUGGCAAGAU AAACAUGCCC AUGUCAGUCA AGACUUGUGA
 4851 CGAUGAGUGU UGCCCCGUCA AUUUUAAAAA GUGCUGCCCU CUUGUGUGUG
 20 4901 GGAAGGCUAU ACAAUUCAUU GAUAGAAGAA CACAGGUCAG AUACUCUCUA
 4951 GACAUGCUAG UCACCGAGAU GUUUGAGGAG UACAAUCAUA GACAUAGCGU
 5001 GGGGACCACG CUUGAGGCAC UGUUCCAGGG ACCACCAGUA UACAGAGAGA
 25 5051 UCAAAAUTUAG CGUUGCACCA GAGACACCAC CACCGCCCGC CAUUGCGGAC
 5101 CYGCUCAAAU CGGUAGACAG UGAGGCUGUG AGGGAGUACU GCAAAGAAAA
 5151 AGGAUGGUUG GUUCCUGAGA UCAACUCCAC CCUCCAAAUU GAGAAACAUG
 30 5201 UCAGUCGGGC UUUCAUUGC UUAACAGGCAU UGACCACAUU UGUGUCAGUG
 5251 GCUGGAAUCA UAUUAUAAU AUUAAGCUC UUUGCGGGUU UUCAAGGUGC
 35 5301 UUAUACAGGA GUGCCCAACC AGAAGCCAG AGUGCCUACC CUGAGGCAAG
 5351 CAAAAGUGCA AGGCCUGCC UUGAGUUCG CCGUCGCAU GAUGAAAAGG
 5401 AACUCAAGCA CGGUGAAAAC UGAAUAUGGC GAGUUAACCA UGCUGGGCAU
 40 5451 CUAUGACAGG UGGGCCGUTU UGCCACGCCA CGCCAAAGCU GGGCCAACCA
 5501 UCUTUGAUGAA UGAUCAAGAG GUUGGUGUGC UAGAUGCCAA GGAGCUAGUA
 5551 GACAAGGACG GCACCAACUU AGAACUGACA CUACUCAAAU UGAACCGGAA
 45 5601 UGAGAAGUUC AGAGACAUCA GAGGCUUCU AGCCAAGGAG GAAGUGGAGG
 5651 UUAUUGAGGC AGUGCUAGCA AUUAACACCA GCAAGUUC CAACAUGUAC
 5701 AUUCCAGUAG GACAGGUCAC AGAAUACGGC UUCCUAAACC UAGGUGGCAC
 50 5751 ACCCACCAG AGAAUGCUUA UGUACAACUU CCCACAAGA GCAGGCCAGU
 5801 GUGGUGGAGU GCUCAUGUCC ACCGGCAAGG UACUGGGUUA CCAUGUUGU
 55 5851 GGAAAUGGCC AUCAGGGCUU CUCAGCAGCA CUCCUCAAC ACUACUUCAA
 5901 UGAUGAGCAA GGUGAAAUG AAUUAUUGA GAGCUCAAAG GACGCCGGU
 5951 UUCAGUCAU CAACACACCA AGUAAAAAA AGUUGGAGCC UAGUGUUTUC
 60 6001 CACCAGGUCU UUGAGGGGAA CAAACAACCA GCAGUACUA GGAGUGGGGA
 6051 UCCACGUCUC AAGGCCAAU UUGAAGAGGC UAUAUUUC AAGUAUUAUG
 6101 GAAAUGUCAA CACACACGUG GAUGAGUACA UGCUGGAAGC AGUGGACCAC
 65

DE 39 39 200 A1

6151	UACGCAGGCC AACUAGCCAC CCUAGAUUUC AGCACUGAAC CAAUGAAACU	
6201	GGAGGACGCA GUGUACGGUA CCGAGGGUCU UGAGGCGCUU GAUCUAACAA	
6251	CGAGUGCCGG UUACCCAUU GUUGCACUGG GUAUCAAGAA GAGGGACAUC	5
6301	CUCUCUAAGA AGACUAAGGA CCUAACAAAG UUAAGGAAU GUAUGGACAA	
6351	GUAUGGCCUG AACCUACCAA UGGUGACUUA UGUAAAAGAU GAGCUCAGGU	
6401	CCAUAGAGAA GGUAGCGAAA GGAAAGUCUA GGCUGAUUGA GCGUCCAGU	10
6451	UUGAAUGAUTU CAGUGGCGAU GAGACAGACA UUUGGUAUUC UGUACAAAAC	
6501	UUUCCACCUA AACCCAGGGG UUGUGACUGG UAGUGCUGUU GGGUGUGACC	15
6551	CAGACCUCUU UUGGAGCAAG AUACCAGUGA UGUUAGAUGG ACAUCUCAU	
6601	GCAUUGAUTU ACUCUGGGUA CGAUGCUAGC UUAAGCCUG UCUGGUUUGC	
6651	UUGCCUAAAA AUGUUACUUG AGAAGCUUGG AUACACGCAC AAAGAGACAA	20
6701	ACUACAUUGA CUACUUGUGC AACUCCCAUC ACCUGUACAG GGAUAAACAU	
6751	UACUUGUGA GGGUGGCAU GCCUCGGGA UGUUCUGGUA CCAGAUUUU	
6801	CAACUCAAUG AUUAACAAUA UCAUAAUUG GACACUAAUG CUAAAAGUGU	25
6851	ACAAAGGGAU UGACUUGGAC CAUUCAGGA UGAUCGCAUA UGGUGAUGAU	
6901	GUGAUCGCAU CGUACCAUG GCCUAUAGAU GCAUCUUUAC UCGCUGAAGC	
6951	UGGUAAGGGU UACGGGCGA UCAUGACACC AGCAGAUAA GAGAGUGCU	30
7001	UUAACGAAGU UACCUGGACC AACGCCACUU UCCUAAAGAG GUAUUUAGA	
7051	GCAGAUAAC AGUACCCUU CCUGGUGCAU CCUGUUAUGC CCAUGAAAGA	35
7101	CAUACACGAA UCAAUUAGAU GGACCAAGGA UCCAAAGAAC ACCCAAGAUC	
7151	ACGUGCGCUC ACUGUGUCUA UUAGCUUGG AUAACGGGA GCACGAUUA	
7201	GAGGAGUUA UCCGUAAAA UAGAAGCGUC CCAGUCGGAC GUUGUUUGAC	40
7251	CCUCCCCGCG UUUUCAACUC UACGCAGGA GUGGUUGGAC UCCUUUAGA	
7301	UUAGAGACAA UUUGAAUUA UUUAGAUUG CUUAACCCUA CUGUGCUAAC	
7351	CGAACCAGAU AACGGUACAG UAGGGUAAA UUCUCCGCAU UCGGUGCGG	45

8. Rekombinante DNA nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotide 532 bis 2041 der Sequenz von Anspruch 7 enthält.

532	CAGCGGAAC CGACUACUUU	
551	GGGUGUCCGU GUUUCAUUUU AUUCCUAUAC UGGCUGCUUA UGGUGACAAU	55
601	UGAGAGAUUG UUACCAUUA GCUAUUGGAU UGGCAUCCG GUGACUAAUA	
		60
		65

DE 39 39 200 A1

651 GAGCUAUUAU AUAUCCCUUU GUUGGGUUUA UACCACUAG CUUGAAAGAG
 701 GUUAAAACAU UACAAUUAU UGUUAAGUUG AAUACAGCAA AAUGGGAGCU
 751 CAAGUAUCAA CGCAAAAGAC UGGGGCACAU GAGACCAGGC UGAAUGCUAG
 801 CGGCAAUUC AUCAUUCACU ACACAAUAU UAAUUAUAC AAGGAUGCCG
 851 CAUCCAACUC AGCCAAUCGG CAGGAUUUCA CUCAAGACCC GGGCAAGUUC
 901 ACAGAACCAG UGAAAGAUUA CAUGAUUAAA UCACUACCAG CUCUCAACUC
 951 CCCACAGUA GAGGAGUGCG GAUACAGUGA CAGGGCGAGA UCAAUCACAU
 1001 UAGGUAACUC CACCAUAACG ACUCAGGAU GCGCCAACGU GGUGGUGGGC
 1051 UAUGGAGUAU GGCCAGAUUA UCUAAGGAU AGUGAGGCAA CAGCAGAGGA
 1101 CCAACCGACC CAACCAGACG UUGCCACAUG UAGGUUCUAU ACCCUUGACU
 1151 CUGUGCAAUG GCAGAAAACC UCACCAGGAU GGUGGUGGAA GCUGCCCGAU
 1201 GCUUUGUCGA ACUUAGGACU GUUUGGGCAG AACAUGCAGU ACCACUACUU
 1251 AGGCCGAACU GGGUAUACCG UACAUGUGCA GUGCAAUGCA UCUAAGUUC
 1301 ACCAAGGAUG CUUGCUGUA GUGUGUGUAC CGGAAGCUGA GAUGGGUUGC
 1351 GCAACGCUAG ACAACACCCC AUCCAGUGCA GAAUUGCUGG GGGGCGAUAC
 1401 GGCAAAGGAG UUGCGGACA AACCGGUCGC AUCCGGGUCC AACAAAGUUG
 1451 UACAGAGGGU GGUGUAUAU GCAGGCAUGG GGGUGGGUGU UGGAAACCUC
 1501 ACCAUUUUCC CCCACCAAUG GAUCAACCUA CGCACCAUA AUAGUGCUAC
 1551 AAUUGUGAUG CCAUACACCA ACAGUGUACC UAUGGAUAAC AUGUUUAGGC
 1601 AUAACAACGU CACCCUAAUG GUUAUCCAU UUGUACCGCU AGAUUACUGC
 1651 CCUGGGUCCA CCACGUACGU CCCAAUACG GUCACGAUAG CCCCAAUGUG
 1701 UGCGGAGUAC AAUGGGUUAC GUUUAGCAGG GCACCAGGGC UUACCAACCA
 1751 UGAUACUCC GGGGAGCUGU CAAUUCUGA CAUCAGACGA CUUCCAUA
 1801 CCAUCCGCCA UGCGGCAAUA UGACGUCACA CCAGAGAUGA GGAUACCUGG
 1851 UGAGGUGAAA AACUUGAUGG AAUAGCUGA GGUUGACUCA GUUGUCCAG
 1901 UCCAAAUGU UGGAGAGAG GUCAACUCUA UGGAAGCAUA CCAGAUACCU
 1951 GUGAGAUCCA ACGAAGGAUC UGGAACGCAA GUAUUCGGCU UCCACUGCA
 2001 ACCAGGGUAC UCGAGUGUUU UAGUCCGAC GCUCCUAGGA G

9. Rekombinante DNA nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotide 2289 bis 3600 der Sequenz von Anspruch 7 enthält.

DE 39 39 200 A1

2289 UA CCGCAGGGGG

2301 UUUUAUUACG UGCUGGUAUC AAACAAACAU AGUGGUCCCA GCGGAUGCCC

2351 AAAGCUCCUG UUAUCAUG UGUUUCGUGU CAGCAUGCAA UGACUUCUCU 5

2401 GUCAGGCUAU UGAAGGACAC UCCUUUCAU UCGCAGCAA ACUUUUUCCA

2451 GGGCCCAGUG GAAGACGCGA UAACAGCCGC UAUAGGGAGA GUUGCGGAUA

2501 CCGUGGGUAC AGGGCCAACC AACUCAGAAG CUAUACCAGC ACUCACUGCU 10

2551 GCUGAGACGG GUCACACGUC ACAAGUAGUG CCGGGUGACA CUAUGCAGAC

2601 ACGCCACGUU AAGAACUACC AUUCAAGGUC CGAGUCAACC AUAGAGAACU

2651 UCCUAUGUAG GUCAGCAUGC GUGUACUUUA CCGAGUAUAA AAACUCAGGU 15

2701 GCCAAGCGGU AUGCUGAAUG GGUUAUAAAC CCACGACAAG CAGCACAACU

2751 UAGGAGAAAG CUAGAAUUCU UUAACUACGU CCGGUUCGAC CUGGAGCUGA 20

2801 CGUUUGUCAU AACAAGUACU CAACAGCCCU CAACCACACA GAACCAAGAU

2851 GCACAGAUCC UAACACACCA AAUUAUGUUA GUACCACCAG GUGGACCUGU

2901 ACCAGAUAAA GUUGAUUCAU ACGUGUGGCA AACAUCUACG AAUCCCAGUG 25

2951 UGUUUUGGAC CGAGGGAAAC GCCCCGCCGC GCAUGUCCA UACCGUUUUUG

3001 AUCAUUGGCA ACGCCUAUUC AAAUUUCUUA GACGGAUGGU CUGAAUUUUC

3051 CAGGAACGGA GUUUACGGCA UCAACACGCU AAACAACAUG GGCACGCUAU 30

3101 AUGCAAGACA UGUCAACGCU GGAAGCACGG GUCCAUAUAA AAGCACCAUU

3151 AGAAUCUACU UCAAACCGAA GCAUGUCAA GCGUGGAUAC CUAGACCACC 35

3201 UAGACUCUGC CAAUACGAGA AGGCAAAGAA CGUGAACUUC CAACCCAGCG

3251 GAGUUACCAC UACUAGGCAA AGCAUCACUA CAAUGACAAA UACGGGCGCA

3301 UUUGGACAAC AAUCAGGGGC AGUGUAUGUG GGGAAUACA GGGUGGUAAA 40

3351 UAGACAUCUA GCUACCAGUG CUGACUGGCA AAACUGUGUG UGGGAAAGUU

3401 ACAACAGAGA CCUCUUAGUG AGCACGACCA CAGCACAUGG AUGUGAUUU

3451 AUAGCCAGAU GUCAGUGCAC AACGGGAGUG UACUUUUGUG CGUCCAAAAA 45

3501 CAAGCACUAC CCAAUUUCGU UUGAAGGACC AGGUCUAGUA GAGGUCCAAG

3551 AGAGUGAAUA CUACCCAGG AGAUACCAAU CCCAUGUGCU UUUAGCAGCU 50

10. Rekombinante DNA nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotide 6059 bis 7130 der Sequenz von Anspruch 7 enthält.

6059 UC AAGGCCAAUU UUGAAGAGGC UAUAUUUUCC AAGUAUAUAG

6101 GAAUUGUCAA CACACACGUG GAUGAGUACA UGCUGGAAGC AGUGGACCAC

6151 UACGCAGGCC AACUAGCCAC CCUAGAUUUC AGCACUGAAC CAAUGAAACU 55

60

65

6201 GGAGGACGCA GUGUACGGUA CCGAGGGUCU UGAGGCGCUTU GAUCUAACAA
 6251 CGAGUGCCGG UUACCCAUAU GUUGCACUGG GUAUCAAGAA GAGGGACAUC
 5 6301 CUCUCUAAGA AGACUAAGGA CCUAACAAAG UUAAGGAAU GUAUGGACAA
 6351 GUAUGGCCUG AACCUACCAA UGGUGACUUA UGUAAAAGAU GAGCUCAGGU
 6401 CCAUAGAGAA GGUAGCGAAA GGAAGUCUA GGCUGAUUGA GGCGUCCAGU
 10 6451 UUGAAUGAUU CAGUGGCGAU GAGACAGACA UUUGGUAUUC UGUACAAAAC
 6501 UUUCCACCUA AACCCAGGGG UUGUGACUGG UAGUGCUGUU GGGUGUGACC
 6551 CAGACCUCUU UUGGAGCAAG AUACCAGUGA UGUUAGAUGG ACAUCUCAUA
 15 6601 GCAUUGAUU ACUCUGGGUA CGAUGCUAGC UUAAGCCUG UCUGGUUUGC
 6651 UUGCCUAAAA AUGUJACUUG AGAAGCUUGG AUACACGCAC AAAGAGACAA
 20 6701 ACUACAUUGA CUACUUGUGC AACUCCCAUC ACCUGUACAG GGAUAAACAU
 6751 UACUUUGUGA GGGUGGCAU GCCUCGGGA UGUUCUGGUA CCAGUAUUUU
 6801 CAACUCA AUG AUUAACAAUA UCAUAAUJAG GACACUAAUG CUAAAAGUGU
 25 6851 ACAAAGGGAU UGACUUGGAC CAAUUCAGGA UGAUCGCAUA UGGUGAUGAU
 6901 GUGAUCGCAU CGUACCCAUG GCCUAUAGAU GCAUCUUUAC UCGCUGAAGC
 6951 UGGUAAGGGU UACGGGCUGA UCAUGACACC AGCAGAUAAAG GGAGAGUGCU
 30 7001 UUAACGAAGU UACUGGACC AACGCCACUU UCCUAAAGAG GUAUUUUGA
 7051 GCAGAUGAAC AGUACCCCUU CCUGGUGCAU CCUGUUAUGC CCAUGAAAGA
 7101 CAUACACGAA UCAAUUAGAU GGACCAAGGA

11. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er eine rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 6 bis 10 enthält.

12. E. coli VP4/2/3, DSM 5558.

13. E. coli, VP1.

14. E. coli 3D^{Pol}.

15. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man es aus einem Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 11 bis 14 nach Aufschluß der Zellen gewinnt oder eine rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 6 bis 10 in geeignete Wirtszellen einbringt und das Polypeptid aus dem Kulturmedium, gegebenenfalls nach Aufschluß der Zellen, gewinnt.

16. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 5, vorzugsweise einem der Ansprüche 2 bis 4 zur Erzeugung von gruppenspezifisch polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern gegen Enteroviren.

17. Gruppenspezifischer immunologischer Nachweis von Enterovirus-Infektionen durch Untersuchung von Blut oder Serum von Patienten, dadurch gekennzeichnet, daß man in einem an sich bekannten immunologischen Test mindestens eines der Polypeptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Antigen zum Nachweis von Antikörpern gegen Enteroviren oder nach Anspruch 16 erzeugte Antikörper zum Nachweis von Virus-spezifischen Antigenen einsetzt.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

Aufbau des **direkten** ELISA für den Enterovirus-spezifischen Antigennachweis bzw. für den Antikörpernachweis

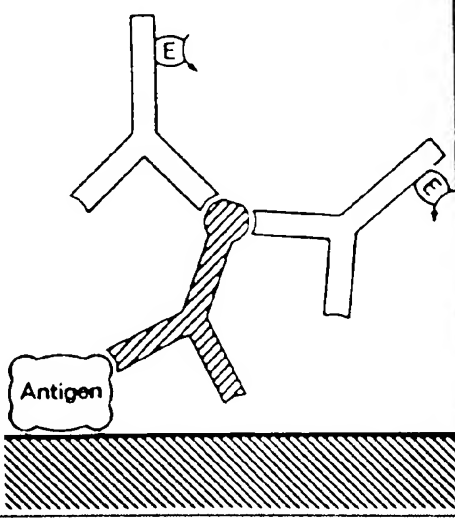
Antigen Nachweis	Antikörper-Nachweis	
<p>Enzymkonjugat zum Nachweis von humanem-Immunglobulin</p> <p>polyklonales Antiserum (aVP4/2/3, aVP1 oder a3D^{P=1})</p> <p>gebundenes Antigen aus Patientenserum</p> <p>Festphase</p>	<p>Enzymkonjugat zum Nachweis von humanem-Immunglobulin</p> <p>polyklonales Antiserum (aVP4/2/3, aVP1 oder a3D^{P=1})</p> <p>gebundenes Antigen aus Patientenserum</p> <p>Festphase</p>	

Fig. 2

Aufbau eines 'Sandwich'-ELISA für den Enterovirus-spezifischen Antikörpernachweis

